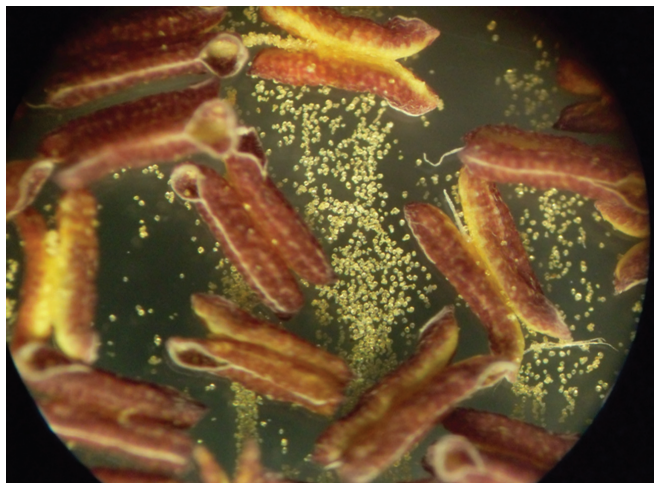


Foto: Adriane Leite do Amaral



Metodologia de Conservação de Pólen de Cana-de-açúcar

*Adriane Leite do Amaral*¹

*João Messias dos Santos*²

*Tassiano Maxwell Marinho Câmara*³

*Geraldo Veríssimo de Souza Barbosa*⁴

Para realizar cruzamentos em cana-de-açúcar é fundamental sincronizar o florescimento das plantas genitoras. Dificuldades na sincronização têm feito com que programas de melhoramento de várias partes do mundo busquem técnicas promotoras de indução ao florescimento. Técnicas de semeadura escalonada e de tratamentos fotoindutivos, com manipulação de fotoperíodo, através de câmaras escuras e campos de iluminação, têm apresentado baixa eficiência e/ou alto custo de manipulação, mesmo em regiões climáticas favoráveis ao florescimento, como no Nordeste do Brasil.

Uma alternativa que pode auxiliar a realização de cruzamentos assíncronos, entre plantas com florescimento não coincidente, é a conservação de pólen de cana-de-açúcar. Várias metodologias já foram testadas visando à aplicação prática do processo de conservação de pólen, mas os resultados foram insatisfatórios ou não permitiram confirmação por técnicas robustas (KRISHNAMURTHI, 1977; MOORE; NUSS, 1987; YONGHUI et al., 1993; YAOHUI; OIYAO, 1994; PRASAD, 2012). Por estas razões, os programas de melhoramento de cana-de-açúcar ainda não dispõem de uma metodologia de conservação de pólen para utilizar em sua rotina de cruzamentos assíncronos.

A metodologia descrita nesta publicação é resultado de uma série de estudos sobre conservação e avaliação da viabilidade de pólen que foram desenvolvidos desde 2009 pela parceria da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) com a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (Ridesa). Os estudos foram conduzidos na Estação de Floração e Cruzamento de Serra do Ouro, na cidade de Murici, AL (09° 13' S, 35° 50' W) a uma altitude de 450 m acima do nível do mar e a 34 km de distância do litoral, e nas dependências da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa e Desenvolvimento de Rio Largo, e no Centro de Ciência Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), localizados na cidade de Rio Largo, AL (09° 28' S, 35° 47' W e 141 m de altitude em relação ao nível do mar). Inicialmente, o método de conservação foi desenvolvido a partir de variações na temperatura de armazenamento e no teor de umidade (AMARAL et al., 2011). Em sequência, foram adaptadas técnicas de avaliação da viabilidade polínica, visando monitorar a conservação do pólen (AMARAL et al., 2013). Finalmente, diversos cruzamentos com pólen conservado foram realizados e as plantas obtidas submetidas à análise de marcadores moleculares para a confirmação dos cruzamentos e validação da metodologia proposta (AMARAL et al., 2012).

¹ Engenheira-agrônoma, doutora em Melhoramento Genético de Plantas, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, UEP - Rio Largo, AL, adriane.amaral@embrapa.br.

² Engenheiro-agrônomo, doutor em Biotecnologia e Melhoramento, pesquisador da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (Ridesa-AL), jms.agronomia@gmail.com.

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, UEP - Rio Largo, AL, tassiano.camara@embrapa.br.

⁴ Engenheiro-agrônomo, mestre em Agronomia, professor da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), gvsbarbosa@gmail.com.

A presente proposta tem por objetivo descrever a metodologia de conservação e avaliação da viabilidade de pólen de cana-de-açúcar desenvolvida pela parceria Embrapa-Ridesa, com o objetivo de viabilizar cruzamentos entre variedades de cana-de-açúcar assíncronas no florescimento.

Metodologia

Anterior à coleta do pólen

Para se iniciar um trabalho de conservação de pólen de cana-de-açúcar é necessário identificar aspectos que determinam e/ou influenciam o florescimento e a viabilidade do pólen, tais como:

Botânica

A inflorescência da cana-de-açúcar é do tipo panícula, com milhares de espiguetas sésseis. Cada espiguetta é uma flor hermafrodita, por apresentar os dois sexos na

mesma flor, ou seja, androceu (masculino) e gineceu (feminino). O gineceu, ou pistilo, apresenta estigmas de vermelhos a roxos, que caracterizam o aspecto plumoso e arroxeado das panículas. O androceu é constituído por três estames, com uma antera cada um (BLACKBURN, 1984) (Figuras 1A, 1B E 1C). Como regra geral, na mesma flor, o gineceu apresenta-se receptivo em momento anterior ao androceu, caracterizando o fenômeno de protoginia e favorecendo a fecundação cruzada. A panícula apresenta um gradiente de maturação do ápice para a base, de forma que, flores do ápice amadurecem antes das flores da base. Dessa forma, a deiscência, ou liberação do pólen, pode ser observada gradualmente e a cada 1/3 da inflorescência ao longo de uma semana.

Fotos: Adriane Leite do Amaral

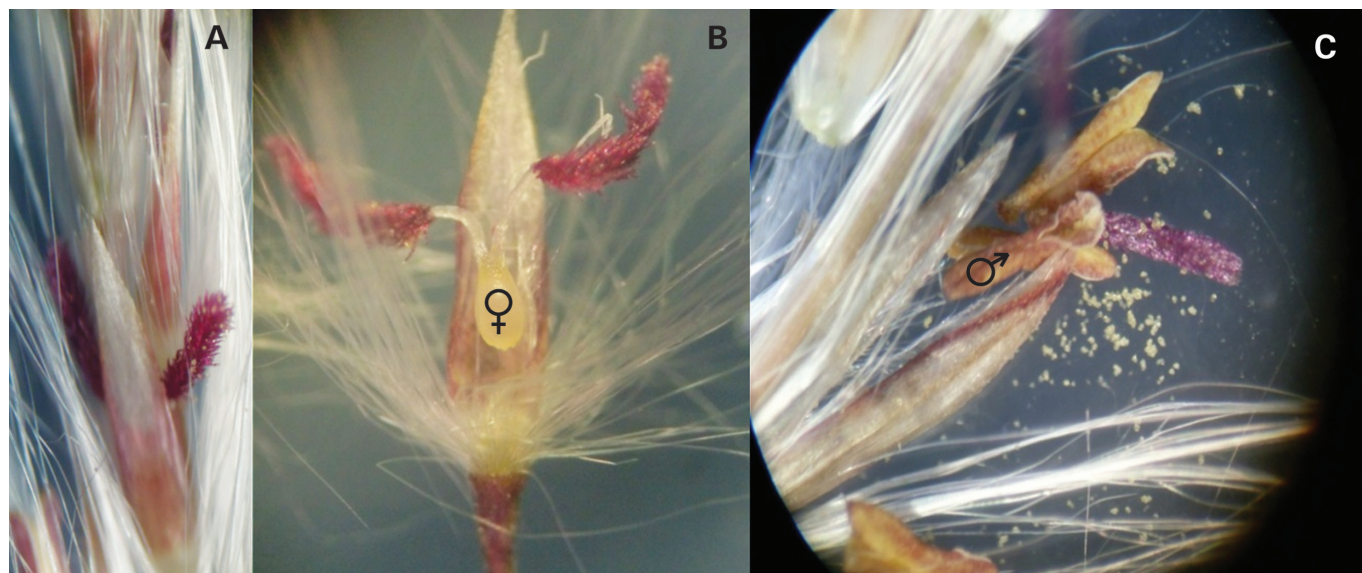


Figura 1. Detalhes da inflorescência de cana-de-açúcar: espiguetas sésseis (A) gineceu com estigmas plumosos e arroxeados (B) e anteras em plena deiscência de pólen (C).

Sexagem

Apesar de a flor de cana-de-açúcar ser considerada hermafrodita, algumas variedades podem se apresentar como tipicamente femininas, com ausência de anteras, anteras sem pólen, pólen inviável, ou como variedades tipicamente machos, pela produção de pólen viável e esterilidade feminina. Para a conservação de pólen é importante selecionar as variedades que se apresentam como machos férteis ou hermafroditas e descartar as femininas (machos inférteis). Anualmente, a sexagem deve preceder a realização dos cruzamentos artificiais de

cana-de-açúcar e também deve fazer parte da caracterização dos acessos de Bancos Ativos de Germoplasmas (BAG). O procedimento prático de sexagem, que geralmente é realizado com corantes citológicos e visualização sobre microscópio estereoscópico, restringe-se às características do pólen e ignora a condição de fertilidade do ovo ou saco embrionário. Para efeitos práticos, plantas que possuem mais de 70% dos grãos de pólen férteis, são classificados e utilizadas como macho em cruzamentos artificiais, e aquelas com menos de 30%, como genitores femininos (GÓMEZ, 1962) (Figuras 2A, 2B e 2C).

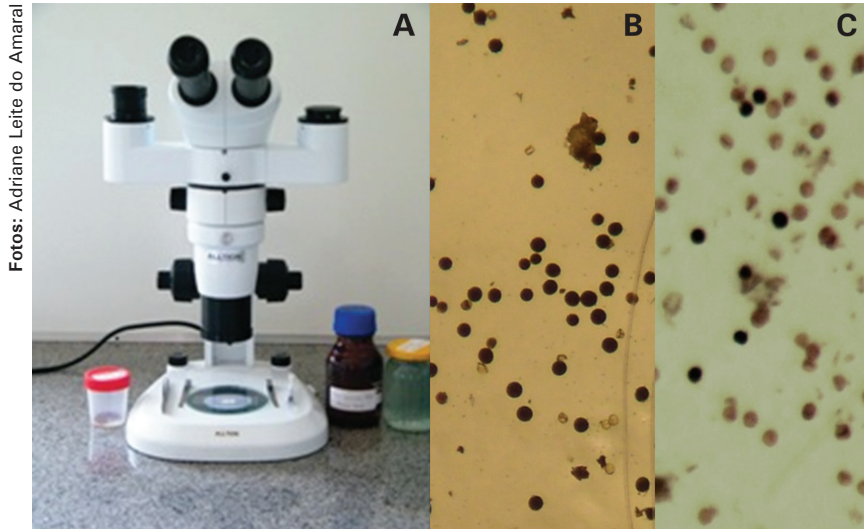


Figura 2. Sexagem em cana-de-açúcar: análise do pólen em microscópio estereoscópico (A), para visualização de grãos de pólen viáveis (corados) e não viáveis (não corados) em solução de lugol, e classificação das variedades para utilização em cruzamentos como genitores masculinos (B) ou femininos (C), de acordo com a proporção de pólen viável.

Local de coleta de pólen

A cana-de-açúcar pode florescer em diversas regiões do Brasil. Um local é considerado ideal para o florescimento e coleta de pólen quando apresenta condições indutivas de fotoperíodo 12 a 12,5 horas, (ARCENEUX, 1967; CLEMENTS; AWADA, 1967), latitudes entre 10° N e 10° S, (CESNIK; MIOQUE, 2004), temperatura superior a 18° C e inferior a 31° C na fase de indução ao florescimento, (PEREIRA et al., 1983) e umidade que favoreçam ao florescimento e viabilidade do pólen. Na ausência destas condições indutivas, o florescimento é sazonal ou pode até não ocorrer. Pequenas variações na temperatura do ar podem provocar grandes mudanças no florescimento e na fertilidade do pólen. São prejudiciais ao florescimento as temperaturas baixas, especialmente as noturnas mínimas iguais ou inferiores a 18° C. A partir da ocorrência de cinco noites frias, com temperaturas inferiores a 18° C, esperam-se prejuízos na indução ao florescimento (CASTRO, 2001). Da mesma forma, temperaturas altas, que ultrapassem 32-35°C, também são consideradas prejudiciais (ELLIS et al., 1967; LEVI, 1983). No litoral do Nordeste, especificamente entre as latitudes 0° a -15° é possível encontrar locais com alta favorabilidade a coleta e conservação de pólen de cana-de-açúcar.

Época de coleta do pólen

O florescimento da planta de cana-de-açúcar ocorre em épocas distintas no Brasil, conforme a latitude, variando de março, nas menores latitudes, até setembro em latitudes maiores. Contudo, nas regiões equatoriais (latitudes próximas a zero) o florescimento pode ser induzido em qualquer época do ano. Em Alagoas (09° 13' S; 35° 50' W), a época de florescimento concentra-se no período de abril-julho, cerca de 90 dias/ano, sendo este

o período preferencial para realização da coleta de pólen. Tradicionalmente, o Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar da Ridesa/AL (PMGCA) classifica as variedades em florescimento precoce, intermediário ou tardio, de acordo com a época de surgimento espontâneo das flores. Essa classificação da época do florescimento é importante porque define os cruzamentos que poderão ser realizados. Variedades com florescimento precoce e tardio não podem ser inter cruzadas devido à barreira temporal de desenvolvimento das flores. Variedades de florescimento intermediário podem ser cruzadas com variedades precoces ou tardias, desde que sejam utilizadas técnicas que favoreçam a sincronia floral.

Para fins de estabelecimento da metodologia, foram consideradas como variedades precoces as que florescem espontaneamente em abril, intermediárias as que florescem em maio e tardias as que florescem em junho.

Coleta do pólen

Antes de proceder à coleta, cabe ressaltar que o pólen é extremamente suscetível a desidratação após ser liberado das anteras (deiscência). Com uma meia-vida de apenas 12 minutos, os grãos de pólen não sobrevivem mais do que 35 minutos num ambiente a 26,5°C e umidade relativa do ar de 67% (VENKATRAMAN, 1922, MOORE, 1976, AUSTRÁLIA, 2004; 2008).

Para coletar pólen, as inflorescências devem ser colhidas de manhã, preferencialmente entre 7 e 8 horas para evitar a desidratação pela exposição ao sol e a altas temperaturas. Para a colheita, devem-se escolher preferencialmente aquelas inflorescências cujas anteras estejam maduras e liberando pólen naturalmente em pelo

menos 1/3 da panícula. As hastes das inflorescências devem ser cortadas no campo, com comprimento mínimo de 100 cm, e imediatamente enviadas ao laboratório (Figuras 3A, 3B e 3D). Para o envio, as panículas devem ser colocadas individualmente em sacos de papel, protegidas externamente por sacos plásticos e acondicionadas em caixas de isopor com gelo. É recomendado intervalo de tempo inferior a trinta minutos entre o corte da panícula e a chegada ao laboratório. Caso ocorram chuvas no período da floração e no horário da coleta, as inflorescências com deiscência de pólen no primeiro 1/3 da panícula podem ser colhidas, ainda que molhadas, para serem preservadas em solução nutritiva de Mangelsdorf (CESNICK; MIOCQUE, 2004). Para favorecer a antese na porção central ou basal destas panículas, as mesmas devem ser mantidas em solução

nutritiva e ao abrigo das chuvas, por um período de até 24 horas para a coleta de pólen imediatamente a deiscência do pólen (Figuras 3C e 3E).

Para o processamento das inflorescências é recomendável que o laboratório esteja numa temperatura amena de $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e que as panículas sejam escovadas com pincéis sobre uma superfície lisa com coloração uniforme, que favoreça a extração e visualização do pólen (Figuras 3F e 3G). O material coletado (pólen e algumas anteras) deverá ser armazenado em frascos preenchidos em no máximo 1/4 de seu volume, podendo ser de vidro ou plástico, com tampa rosca, e de igual diâmetro no fundo e na abertura, para uma maior circulação de ar. A quantidade de pólen extraída das anteras é variável, contudo, 30 panículas podem possibilitar a coleta de 1000 a 2000 mg de pólen.



Figura 3. Inflorescências de cana-de-açúcar e coleta de pólen: campo de florescimento profuso e espontâneo de cana-de-açúcar (A), panículas coletadas (B) e conservadas em solução nutritiva para coleta de pólen (C), desenvolvimento da panícula (D), panícula com produção e exposição de anteras na porção mediana (E), coleta de pólen com pincel (F) e visão do pólen, com algumas anteras coletadas (G).

Desidratação do pólen em pré-armazenagem

Apesar da sensibilidade do pólen ao ressecamento, é importante desidratar para conservar a baixas temperaturas, porque o excesso de umidade pode gerar cristais de gelo e danificar os tecidos (YOGESHA et al., 1999; PRASAD, 2012). Para a desidratação, em pré-armazenagem, é recomendada utilização de sílica gel azul, que tem capacidade de adsorção de até 30% de seu peso em água (HAIPENG et al., 1993). Para desidratar 2000 mg de pólen, aconselha-se dividir esse volume em quatro frascos de 50 mL cada. Os frascos devem ser mantidos sem tampa

e acondicionados em um dessecador de vidro, contendo 1000 g de sílica gel azul e fechado hermeticamente. Cada reservatório deverá conter pólen de uma única variedade, para evitar contaminações, tendo em vista que os frascos ficam abertos para a sílica adsorver umidade do ar e das amostras de pólen. A desidratação deve ocorrer por um tempo de uma hora em geladeira (4° C) (Figura 4). Com este tempo de desidratação, obtém-se uma redução média de 20% do peso total da amostra, que corresponde à redução de umidade do pólen e favorece a conservação (AMARAL et al., 2011).

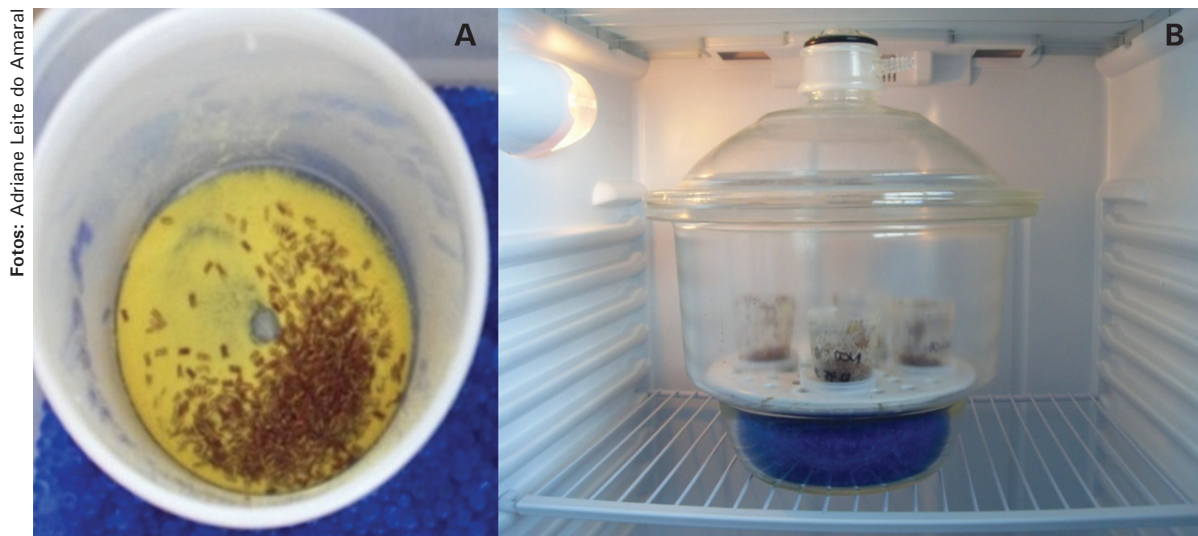


Figura 4. Desidratação de amostras de pólen de cana-de-açúcar em sílica gel azul (A) em dessecadores de vidro a 5°C (B).

Armazenamento

Imediatamente após a desidratação, os frascos devem ser fechados, transferidos para um freezer e armazenados a uma temperatura de -18° C (Figura 5). Os resultados demonstraram que, amostras contendo polens com algumas anteras, que são desidratadas em 20% do seu peso e armazenadas a temperatura de -18° C podem permitir conservação por períodos de tempo superiores a trinta dias (AMARAL et al., 2011; YAOHUI; OIYAO, 1994). O tempo de armazenamento de trinta dias

pode ser considerado suficiente para obter a sincronia entre variedades que florescem em diferentes épocas, dentro da mesma estação de florescimento. Contudo, existe perspectiva de prolongar ainda mais o tempo de conservação, para permitir a realização de cruzamentos entre plantas de estações de florescimento distintas, onde o pólen foi produzido no ano anterior. O êxito no aumento do tempo de armazenagem depende, além da técnica de coleta e conservação, das condições ambientais locais e do germoplasma que deu origem ao pólen.



Figura 5. Frascos com amostras de pólen armazenadas em freezer, com temperatura de -18° C.

Análises de viabilidade polínica

A viabilidade do pólen deve ser avaliada, preferencialmente, com diferentes técnicas e em pelo menos duas etapas distintas. É importante avaliar a viabilidade polínica imediatamente após a coleta do pólen e, imediatamente antes de se procederem aos cruzamentos, (com trinta dias de armazenamento), para garantir que grãos de pólen viáveis sejam armazenados e utilizados em cruzamentos.

A análise de viabilidade é importante no processo de conservação, pois quanto maior a viabilidade inicial do pólen, maiores as chances de obtenção de plantas proveniente do cruzamento com pólen conservado. Para aplicação da metodologia de conservação, recomenda-se a utilização de amostras de grão de pólen com viabilidade inicial superior a 50%. Para uma avaliação acurada da viabilidade do pólen é recomendado o uso simultâneo de três análises:

- i) Integridade citológica (coloração com solução de lugol).
- ii) Viabilidade in vitro (germinação do pólen em meio-de-cultura).
- iii) Viabilidade in vivo (realização de cruzamentos artificiais).

Integridade citológica

A análise de integridade citológica dá uma idéia inicial da qualidade do pólen coletado porque permite verificar se existe rompimento de membranas ou deficiência nas

reservas de amido. Essa análise é feita por técnicas de coloração com corantes citológicos, sendo a solução de lugol (1 grama de iodo, 2 gramas de iodeto de potássio e 100 ml de água destilada) a mais utilizada pelos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar (MACHADO JÚNIOR, 1987). Para a coloração, uma pequena amostra de pólen deve ser depositada em uma lâmina de vidro, com auxílio de uma pinça, em uma gota de solução de lugol. A lâmina deve ser analisada ao microscópio estereoscópico (aumento de 40 vezes). A visualização e análise podem ser feitas de diversas formas: através de visualização direta e imediata a coleta, por um avaliador experiente; através de uma câmera digital acoplada ao microscópio para a captura e posterior avaliação da imagem, que pode ser através de visualização pelo olho humano e/ou por programas computacionais de análise de imagens. Independente da forma de avaliação, cada lâmina poderá gerar um campo de visualização, que dividido em quatro setores corresponderá a quatro repetições (Figura 6). A coloração com solução de lugol permite distinguir grãos de pólen em duas tonalidades: i) grãos de pólen corados (tons de marrom) - função da presença de amido e da integridade da membrana, indicando viabilidade e; ii) grão de pólen descorados (amarelo pálido e/ou translúcidos), que são considerados inviáveis ou mal formados, pela ausência ou deficiência de reservas de amido ou, pelos defeitos e/ou rompimentos das membranas (Figura 6A).

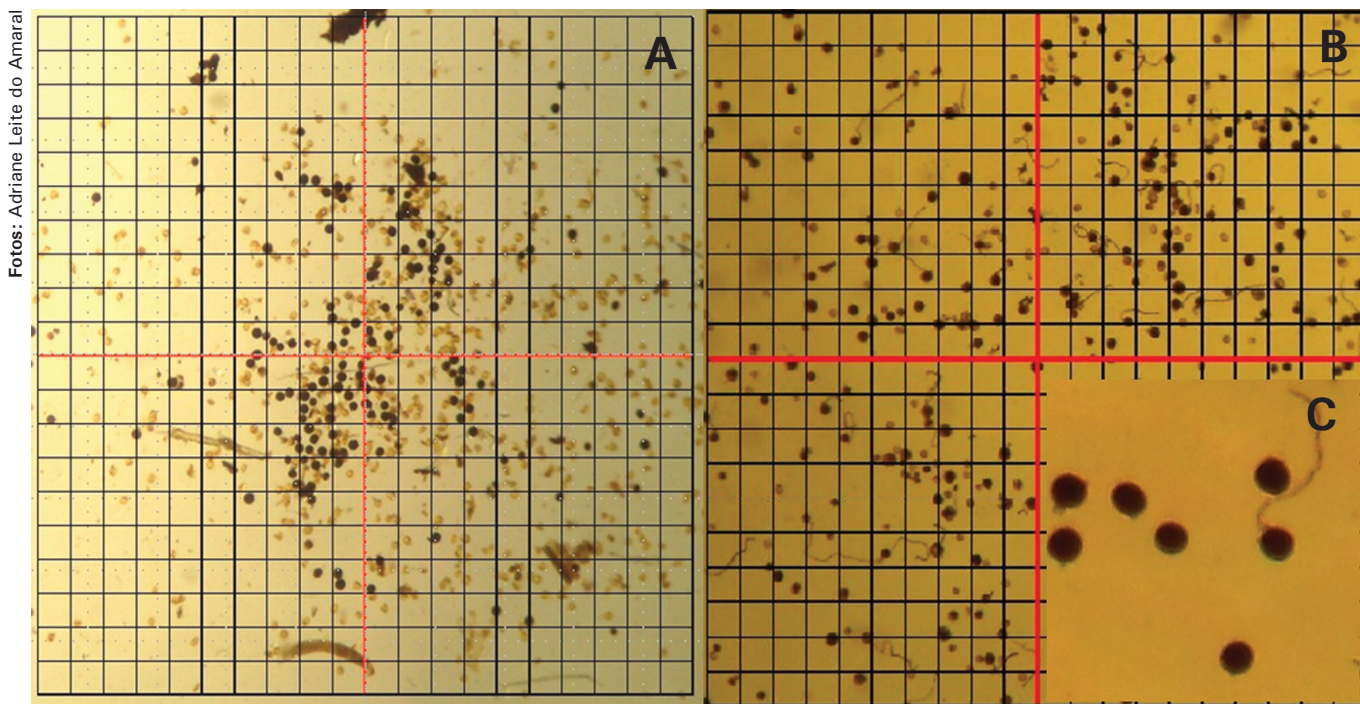


Figura 6. Avaliações de viabilidade do pólen: Integridade celular (A) e germinação in vitro (B), em detalhe a germinação com desenvolvimento de tubo polínico (C).

A contagem dos grãos de pólen corados e dos não corados permite estimar a porcentagem de viabilidade polínica através da fórmula:

$$\text{Viabilidade do pólen (\%)} = \frac{\text{Nº de grãos de pólen corados}}{\text{Nº de grãos de pólen total}} \times 100$$

Viabilidade in vitro

Para a avaliação de germinação do pólen, pode ser utilizado o meio de cultura adaptado de Krishnamurthi (1977) que contém em sua constituição: ácido bórico (100 ppm), nitrato de cálcio (60 ppm), sulfato de magnésio (100 ppm) e 30% de açúcar por 1 litro de H₂O (AMARAL et al., 2013) com maior eficiência do que foi obtido por Yaohui e Oiyao (1994). Para a avaliação da germinação in vitro devem ser executados os seguintes passos:

- i) Depositar uma amostra de pólen sob uma gota de meio de cultura em lâmina histológica.
- ii) Deixar a amostra em repouso por cerca de uma hora, tempo suficiente para que grãos de pólen viáveis possam emitir tubos polínicos.
- iii) Observação das lâminas com estereomicroscópio (aumento de 40 vezes).
- iv) Contagem e cálculo da porcentagem de pólen germinado. Deve ser considerado pólen germinado aquele em que na visualização apresentar emissão de tubo polínico com comprimento superior ao diâmetro do próprio pólen (WANG et al., 2004).

É importante que a germinação do pólen seja aferida em dois momentos distintos: em pré-armazenamento (imediatamente após a colheita das panículas) e em pós-armazenamento (após trinta dias de armazenamento) (Figuras 6B e 6C).

Viabilidade in vivo

A viabilidade in vivo do pólen pode ser aferida indiretamente, pelo número de sementes e de plantas, resultantes de cruzamentos artificiais com o pólen conservado. Para a avaliação da viabilidade in vivo é necessário cumprir quatro etapas:

Identificação, coleta e processamento do genitor feminino

Nessa etapa, são identificadas plantas com florescimento visível (panículas receptivas em pelo menos um terço de sua extensão) para serem utilizadas como genitores femininos. As plantas devem ser cortadas na base do colmo, rentes ao solo, e imediatamente imersas em recipiente com solução nutritiva de Mangelsdorf e levadas

para uma área onde será realizado o processamento. É recomendável a realização de um desbaste, com corte das folhas, para se evitar perda excessiva de umidade nas plantas e, a realização de emasculação das panículas (Figuras 7A e 7B). Para a emasculação, é recomendado que as panículas sejam imersas em água aquecida (50°C) por um período de quatro a cinco minutos (MACHADO JÚNIOR et al., 1989), para evitar a competição do pólen do genitor feminino, com o pólen conservado (Figura 7C).

Cruzamento e obtenção das sementes

O cruzamento é realizado com o pólen conservado. Os potes contendo pólen conservado do genitor masculino devem ser retirados do freezer e mantidos à sombra e em temperatura ambiente (24° C) por quinze minutos, para descongelar, antes da polinização das panículas do genitor feminino. A polinização pode ser feita com o auxílio de um pincel ou despejando o pólen em saco de papel com as panículas (Figura 7D). Imediatamente à polinização, as panículas devem ser cobertas com campânulas e mantidas em repouso em ambiente fresco e úmido, sendo indicadas áreas às margens de mata ciliar com umidade e temperaturas amenas para favorecer a ocorrência da fertilização (Figuras 7E, 7F e 7G). Após a primeira polinização, se ainda houver pólen congelado, é aconselhável realizar um repasse no dia seguinte, ou seja, uma segunda polinização. Após cinco dias, as plantas fertilizadas devem ser transportadas para um ambiente protegido (galpão) onde ficarão em descanso durante cerca de trinta dias para favorecer o desenvolvimento e maturação das sementes. Durante esse período, é necessário proceder à reposição periódica da solução nutritiva para evitar ressecamento das plantas. Após esse período, as panículas são coletadas e processadas para a retirada das sementes. Inicialmente, as panículas devem ser colocadas na sala de secagem, mantidas a uma temperatura de 34°C e 55% de Umidade Relativa (U.R.), permanecendo os sacos abertos e bem espalhados, por um período de doze a vinte e quatro horas. Após o processo de secagem, as sementes devem ser separadas manualmente do ráquis e armazenadas em um ambiente com temperatura de 21° C e 60% U.R. (BRILHO et al., 1981). Finalmente, deve ser feito o deslindamento, que consiste em separar manualmente a semente dos materiais inertes (palha, estigma, entre outros) que a envolvem para evitar que, num semeio, os mesmos prejudiquem a germinação ou dificultem a determinação da porcentagem de plântulas por grama utilizadas no semeio (MARTINS, 2005).

Fotos: Adriane Leite do Amaral

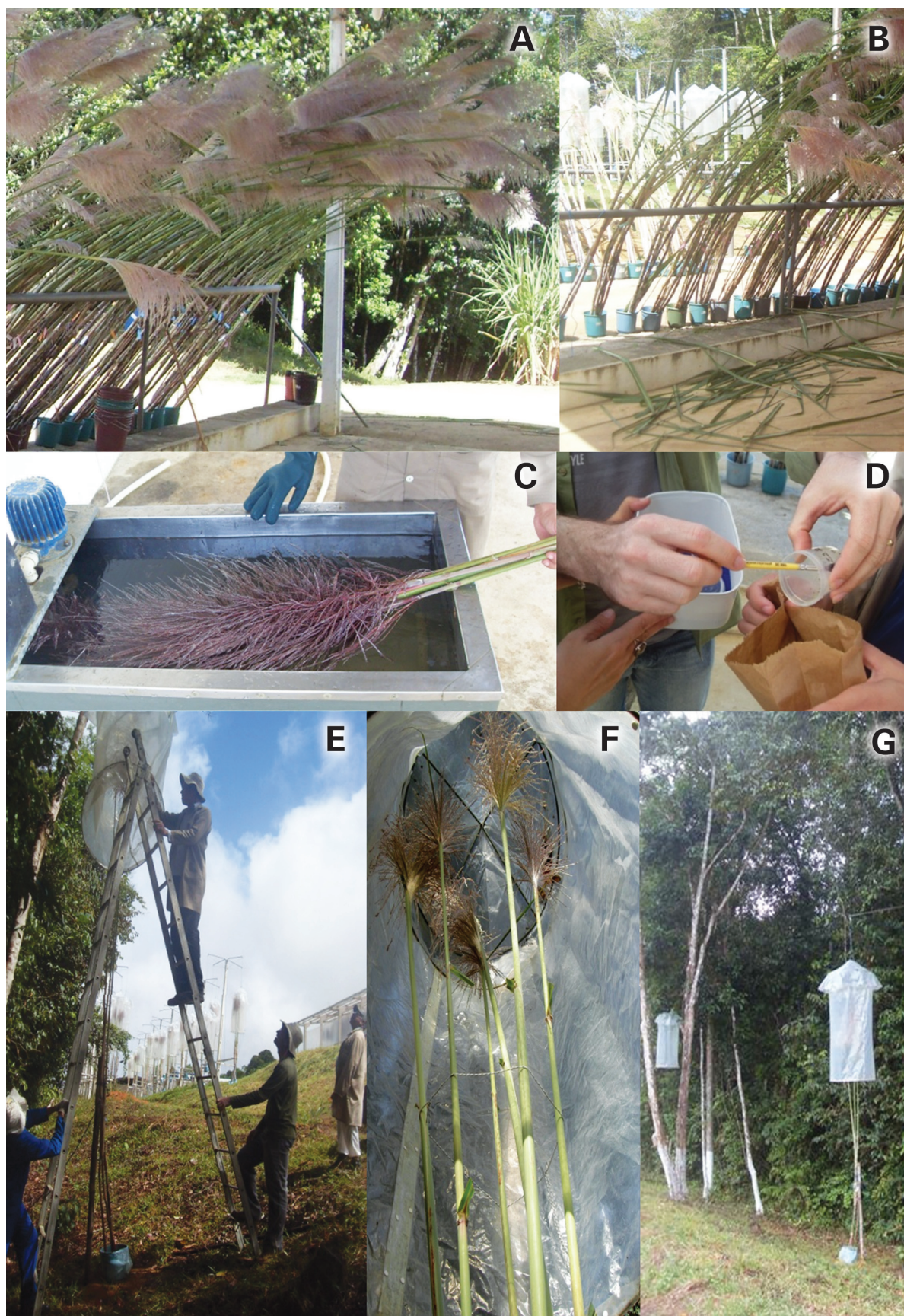


Figura 7. Cruzamentos em cana-de-açúcar na Serra do Ouro, Murici, AL, utilizando pólen armazenado por trinta dias. Detalhes da coleta de panículas do genitor feminino (A), desbaste das folhas (B), emascação (C), polinização com pólen conservado (D-E), panículas protegidas na campânula (F) e situadas próximas a mata (G).

Semeadura das sementes

Para a germinação das sementes, geradas por cruzamentos com pólen armazenado, uma amostra de 2 g sementes/variedade pode ser semeada em caixas com substrato (duas partes areia/uma parte terra) e avaliada vinte dias após a semeadura (Figura 8).

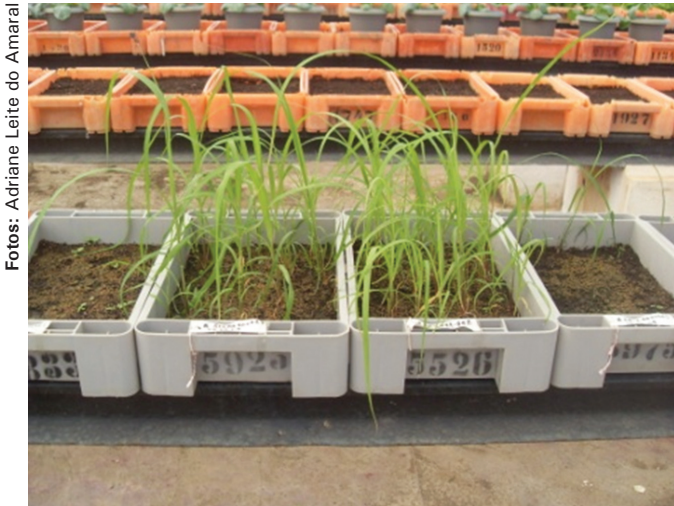


Figura 8. Plantas geradas em cruzamentos artificiais com pólen conservado por trinta dias.

Ao atingirem um mínimo de 5 a 6 cm, as plântulas podem ser repicadas individualmente para copos, com 200 mL de substrato. Após a repicagem, cerca de trinta a quarenta dias, quando as plantas atingirem um mínimo de 30 cm de estatura, deverão ser coletadas amostras de folhas para realização do teste de paternidade e somente depois disso, ocorrerá o transplante para o campo. A partir de então, as plantas geradas com pólen conservado poderão fazer parte da seleção artificial para desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar.

Análise de paternidade

A efetividade dos cruzamentos, com o pólen conservado, pode ser comprovada através de um teste de paternidade, com análise molecular de marcadores microssatélites. O teste de paternidade recomendado (AMARAL et al., 2012a; 2012b) inclui três marcadores SSR (SCC05, SCC06 e SCC92) que foram previamente estudados para esse fim, no laboratório de recursos genéticos no Campus Arapiraca da Universidade Federal de Alagoas. As sequências dos marcadores SSR estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências de três marcadores microssatélites (SSR) desenvolvidos para o teste de paternidade de plantas de cana-de-açúcar obtidas com pólen conservado.

SSR	GenBank ID	Motif	Primer (5' - 3')
SCC05	CA205346	GATA ₍₁₀₎	F: CGGAATCCAATTCGTACGTT R: CATTGGTTGCACCACAGTTC
SCC06	CA207738	AAAG ₍₁₀₎	F: TATCCACCGGGAACAAGAA R: GGGATTGTAGCGACGAGTTG
SCC92	CA210595	ATCT ₍₁₅₎	F: CTCCGCATTAGCCATTTCC R: TGGTACTCGTCCATGTCGTC

A partir da análise do perfil dos microssatélites, a descendência de cada cruzamento deverá ser classificada como: híbridos verdadeiros, autofecundação, ou contaminantes. Na interpretação dos testes de paternidade, progênies que apresentarem presença de alelos específicos do genitor masculino (pólen armazenado) deverão ser classificadas como híbridos verdadeiros dos dois genitores; progênies que apresentarem apenas alelos do genitor feminino deverão ser classificadas como resultantes de autopolinização e, quando apresentarem alelos do genitor feminino juntamente com alelos distintos do genitor masculino, a descendência deverá ser considerada como resultante de pólen contaminante ou "alienígena".

Considerações Finais

A aplicação da metodologia de conservação de pólen no BAG Ridesa-AL, nos anos de 2009 e 2012, permitiu a obtenção de diversas plantas, a partir de cruzamentos entre variedades assíncronas. As plantas obtidas e com paternidade confirmada, comprovaram a eficiência da metodologia de conservação de pólen e ressaltam o potencial de uso na rotina de programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

Essa metodologia de conservação do pólen também apresenta potencial para realização de cruzamentos interespecíficos incluindo o complexo *Saccharum*; para a formação de bancos de pólen, configurando uma nova proposta para conservação *ex situ* e para aquisição/troca de material genético (pólen) entre os programas de melhoramento de cana; para o intercâmbio de germoplasma de cana-de-açúcar, com importação/exportação, mediante envio de pólen; para pesquisas com pólen, em locais onde não ocorre florescimento espontâneo da cana-de-açúcar e; para aplicações diversas na área de biotecnologia, onde grãos de pólen conservados poderão beneficiar/viabilizar a aplicação de ferramentas biotecnológicas como a transformação genética.

Agradecimentos

Ao professor Antonio Maria Cardoso Rocha e ao pesquisador Antônio Dias Santiago pela contribuição no desenvolvimento da parceria Ridesa, UFAL e Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Aos técnicos da Estação de Floração e Cruzamento de Serra do Ouro, Ridesa/UFAL.

Ao Doutorando Luiz Sérgio Costa Duarte Filho e ao professor Cícero Carlos Almeida pelo suporte na realização dos cruzamentos e nas análises moleculares de paternidade.

Referências

- ALELLYX APPLIED GENOMICS. Informações relevantes sobre a cana-de-açúcar para a regulamentação de variedades transgênicas, **White Paper Sugarcane-Allelyx**. 2008. 43 p. Disponível em: <<https://portal.ilsa.org/rf/scientific/BrasilDocuments/Shared%20Documents/Workshop%20Documents/White%20Paper%20sugarcane.pdf>>. Acesso: junho 2011.
- AMARAL, A. L.; SANTOS, J. M.; MORAIS, L. K.; BARBOSA, G. V. S.; ROCHA, A. M. C.; ALMEIDA, C. C.; SILVA, P. A.; AGUIAR, M. S.; CAMARA, T. M. M.; SANTIAGO, A. D. Storage of sugarcane pollens. In: BALANCING SUGAR AND ENERGY PRODUCTION IN DEVELOPING COUNTRIES: SUSTENTABLE TECHNOLOGIES AND MARKETING STRATEGIES, 2011, New Deli. **Proceedings...** Índia, 2011.v. 1, p. 570-573.
- AMARAL, A. L.; SANTOS, J. M.; CAMARA, T. M.; DUARTE FILHO, L. S. C.; ALMEIDA, C. C.; BARBOSA, G. V. S.; SILVA, P. A.; MORAIS, L. K.; AGUIAR, M. S. Conservação de pólen de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém. **Anais...** Belém, 2012a.
- AMARAL, A. L.; SANTOS, J. M.; CAMARA, T. M. M.; DUARTE FILHO, L. S. C.; BARBOSA, G. V. S.; SILVA, P. A.; ROCHA, A. M. C. Pollen Storage For Asynchronous Crossings In Sugarcane. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NEW PARADIGMS IN SUGARCANE RESEARCH, 2012 Coimbatore. **Proceedings...** India, 2012b. v. 1, p. 6-7.
- AMARAL, A. L.; SANTOS, J. M.; CÂMARA, T. M.; DUARTE FILHO, L. S.; BARBOSA, G. V. S.; SILVA, P. A. Pollen Storage for Asynchronics Crosses In Sugarcane. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 28., 2013, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 2013. (No prelo).
- ARCENEUX, G. Flowering of sugarcane. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 1967, Amsterdam. **Proceedings...** Amsterdam: Elsevier, 1967. v. 12, p. 780-784.
- AUSTRALIA GOVERNMENT. The Biology and Ecology of Sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrids). In: AUSTRALIAN Government Office of the gene Technology regulatory. 2004. Disponível em: <www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/...4/.../biologysugarcane.rtf>. Acesso em: fev. 2011.
- AUSTRALIA GOVERNMENT. The Biology of the *Saccharum* spp. In: AUSTRALIAN Government Office of the gene Technology regulatory. 2008. Disponível em: <www.ogtr.gov.au>. Acesso em: mar. de 2011.
- BLACKBURN, F. **Sugar-cane**. England: Longman House, 1984. 414 p.
- BRILHO, F. F. C.; GIRARD, G. C. L.; CALHEIROS, G. G. **Treinamento de especialização sobre cultura da cana-de-açúcar para agrônomos: melhoramento**. Maceió, 1981.
- CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 307 p.
- CASTRO, P. R. C. **Fisiologia vegetal aplicada à cana-de-açúcar**. Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 2001. 7 p.
- CLEMENTS, H. F.; AVADA, M. Experiments on the artificial induction of flowering in sugar cane. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 1967. **Proceedings...** Amsterdam, 1967. v. 12, p. 795-812.
- ELLIS, T. O. BREEMEN, J. F. VAN; ARCENEUX, G. Flowering of sugarcane in reaction to maximum temperature during the induction period. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 1965, San Juan, Amsterdam: Elsevier. **Anais...** Amsterdam, v. 1, n. 12, 1965. p. 12.
- KRISHNAMURTHI, M. The sugarcane pollen. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 1977, Brasil. **Proceedings...** Brasil: ISSCT Impress, 1977. v. 16, p. 157-164.
- MACHADO JÚNIOR, G. R.; QUEIROZ, J. E.; BRAGA JÚNIOR, R. L. C. Estudo da emasculação de variedades de cana-de-açúcar. **Boletim Técnico Copersucar**, São Paulo, v. 45, p. 3-5, 1989.

MARTINS, G. O. **Programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar do estado de Alagoas**. 2005. 50 f. (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo 2005.

MOORE, P. H.; NUSS, K. J. Flowering and flower synchronization. In: HEINZ, D. J. **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 273-311.

MOORE, P. H. Studies on sugarcane pollen II. Pollen storage. **Phyton Revista Internacional De Botânica Experimental**, Argentina, v. 34, p. 71-80, 1976.

VENKATRAMAN, R. S. T. S. Germination and preservation of sugarcane pollen. **Agricultural Journal of India**, Calcutta, v. 17, p. 127-132, 1922.

HAIPENG, G.; HONG, H.; YUANBIA, O. Studies on the pollen moisture and drying methods of sugarcane and the relative grass. **Sugarcane and canesugar**, China: Guangxi Sugarcane Research Institute, 1993. v. 4, p. 9-12.

MACHADO JÚNIOR, G. P. Melhoramento da Cana-de-açúcar. In: **cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill; Paranhos, 1987. p.165-186. GÓMEZ, A. F. **Caña de azúcar**. 2. ed. Caracas: Edicampa, 1962. 661 p.

PEREIRA, A. R.; BARBIERI, V.; VILA NOVA, N. A. Condicionamento climático da indução ao florescimento em cana-de-açúcar. **Boletim Técnico Planalsucar**, São Paulo, v. 5, p. 5-14, 1983.

PRASAD, N. R. Pollen storage and hybridization in sugarcane. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NEW PARADIGMS IN SUGARCANE RESEARCH, 2012, Coimbatore. **Proceedings...** India, 2012. p. 33-34.

YONGHUI, L.; HELONG, XU. Studies on the sugarcane pollen storage at low temperature. **Sugarcane and canesugar**, Industrial Crops Research Institute, China, v. 4, p. 9-12, 1993.

YAOHUI, Z.; OIYAO, H. Low temperature storage of *S. spontaneum* pollen and their viability. **Sugarcane and canesugar**, Siri: Hainan Sugarcane Breeding Station, 1994. v. 2, p. 7-9.

YOGESHA, H. S.; NAGARAJA, A.; SHARMA, S. P. Pollination studies in hybrid tomato seed production. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, p. 115-122, 1999.

WANG, Z. Y.; GE, Y.; SCOTT, M.; SPANGENBERG, G. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*fescue arundinacea*) (poaceae) plants. **American Journal of Botany**, Ohio, US, v. 91, p. 523-530, 2004.

Comunicado Técnico, 127

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Endereço: Avenida Beira Mar, 3250, CP 44,
CEP 49025-040, Aracaju - SE.

Fone: (79) 4009-1344

Fax: (79) 4009-1399

E-mail: sac@cpatc.embrapa.br

Disponível em http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/cot_127.pdf

1ª edição (2012)

Comitê de publicações

Presidente: *Ronaldo Souza Resende*.

Secretária-executiva: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Membros: *Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Edson Patto Pacheco, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, Joézio Luiz dos Anjos, Josué Francisco da Silva Junior, Paulo César Falanghe Carneiro, Semíramis Rabelo Ramalho Ramos e Viviane Talamini*.

Expediente

Supervisora editorial: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Tratamento das ilustrações: *Ailla Freire de Azevedo*

Editoração eletrônica: *Ailla Freire de Azevedo*